COMPLEMENTARY MEDICINE JOURNAL
Volume 15, Issue 4, Winter 2025
https://cmja.arakmu.ac.ir/

Original Article

Effect of Hydroalcoholic Extract of *Pistacia atlantica* Fruit on the Formation of Glycated Hemoglobin (HbA1c) in Human Blood Sample Under *In Vitro* Conditions

Seyyedeh Maryam Zamanian Dehkordi[1], Mohammad Zavarshani[2], Mohsen Jafarian Dehkordi[3*], Mohsen Asgari[4], Maryam Zavarshani[5]

1.Doctor of Veterinary Medicine, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Shahrekord, Shahrekord, Iran
2.PhD in Bacteriology, Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
3.Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Shahrekord, Shahrekord, Iran
4.BSc in Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran
5.PhD student in Microbiology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

*** Corresponding author:** Mohsen Jafarian Dehkordi, Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. Email: mjafariand@yahoo.com

DOI: 10.22034/cmja.15.4.311

How to Cite this Article:
Zamanian Dehkordi SM, Zavarshani M, Jafarian Dehkordi M, Asgari M, Zavarshani M. Effect of Hydroalcoholic Extract of *Pistacia atlantica* Fruit on the Formation of Glycated Hemoglobin (HbA1c) in Human Blood Sample Under *In Vitro* Conditions *Complement MedJ*. 2025;15(4): 311-321. DOI: 10.22034/cmja.15.4.311

Received: .01 July 2025
Accepted: 05 January 2026

Keywords:

Glycation
Glycated Hemoglobin (HbA1c)
In Vitro
Plant Extract
Pistacia atlantica

© 2025 Arak University of Medical Sciences

Abstract

Introduction: Glycated hemoglobin (HbA1c) is considered one of the most important indicators for long-term glycemic control and progression of diabetic complications. The present study aimed to investigate the effect of the hydroalcoholic extract of *Pistacia atlantica* fruit on HbA1c formation in human blood samples under *in vitro* conditions.

Methods: In this *in vitro* study, human blood samples were exposed to glucose concentrations of 20 and 40 mM and treated with different concentrations (0.1, 0.5, and 1 g/dL) of the hydroalcoholic extract of *Pistacia atlantica* fruit. HbA1c levels were measured after 7 and 14 days of incubation using a colorimetric method, and the results were compared with those of the positive control group. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test, with a significance level set at $P<0.05$.

Results: The results demonstrated that treatment of human blood samples with the hydroalcoholic extract of *Pistacia atlantica* under hyperglycemic conditions (20 and 40 mM glucose) led to a statistically significant reduction in HbA1c levels compared with the positive control group ($P<0.05$). This reduction was observed at both incubation time points, with a more pronounced inhibitory effect on day 14 compared to day 7. The greatest decrease in HbA1c was consistently observed at the extract concentration of 0.1 g/dL across all experimental conditions. In contrast, higher extract concentrations exhibited a reduced inhibitory effect, and in some conditions, a relative increase in HbA1c levels compared to the positive control was observed. Overall, the findings of this study indicated that the inhibitory effect of the hydroalcoholic extract of *Pistacia atlantica* on HbA1c formation was dependent on both dose and incubation time.

Conclusion: The findings of the present work indicated that the hydroalcoholic extract of *Pistacia atlantica* fruit possessed the potential to inhibit HbA1c formation under *in vitro* conditions and could exert a role in the prevention or attenuation of diabetes-related complications through the suppression of non-enzymatic glycation. However, further studies are required to clarify the clinical relevance of these effects.

Copyright © 2025 The Author(s); Published by Complementary Medicine Journal. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

INTRODUCTION

Diabetes mellitus is a prevalent chronic metabolic disorder characterized by persistent hyperglycemia, which contributes to the development of vascular complications largely through non-enzymatic protein glycation and the formation of advanced glycation end products (AGEs) (1). Glycated hemoglobin (HbA1c) is a key indicator of long-term glycemic control and may act as a precursor for hemoglobin-derived AGEs (3). Although plant-derived bioactive compounds have attracted attention as glycation inhibitors, direct *in vitro* studies of their effects on human hemoglobin remain limited (7). *Pistacia atlantica*, a native Iranian plant rich in phenolic and terpenoid compounds, exhibits notable antioxidant properties (10). The present study aimed to evaluate the effect of *Pistacia atlantica* hydroalcoholic fruit extract on HbA1c formation under hyperglycemic *in vitro* conditions.

METHODS

In this *in vitro* study, fruits of *Pistacia atlantica* were collected from mountainous regions and botanically authenticated, after which a hydroalcoholic extract was prepared using a water–ethanol solvent system (12). Hemoglobin was isolated from venous blood obtained from a single healthy donor with no history of diabetes mellitus or metabolic disorders in order to minimize inter-individual variability (7). To simulate hyperglycemic conditions, hemoglobin samples were exposed to glucose at concentrations of 20 and 40 mM. The samples were then treated with different concentrations of the hydroalcoholic extract of *Pistacia atlantica* (0.1, 0.5, and 1 g/dL) and incubated in sealed microtubes for 7 and 14 days at 37°C under dark conditions. All incubations were performed in phosphate buffer with controlled pH to prevent pH-related interference with the glycation process (13). Glycated hemoglobin (HbA1c) levels were determined using a validated colorimetric method with a commercial assay kit (14). Data were expressed as mean±standard deviation, and statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test. In addition, a P-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

The treatment of human hemoglobin samples with the hydroalcoholic extract of *Pistacia atlantica* under hyperglycemic conditions resulted in significant modulation of HbA1c formation in a dose and time-dependent manner. At a glucose concentration of 20 mM, incubation with the extract at 0.1 g/dL for 7 days led to a statistically significant reduction in HbA1c levels compared with the positive control ($P<0.05$), whereas higher extract concentrations did not produce a significant decrease at this time point. After 14 days of incubation, all tested extract concentrations (0.1, 0.5, and 1 g/dL) significantly reduced HbA1c levels compared with the positive control ($P<0.05$), with the greatest reduction at 0.1 g/dL. Notably, the magnitude of HbA1c reduction at day 14 was greater than that observed at day 7, indicating a time-dependent enhancement of the inhibitory effect. Under more severe hyperglycemic conditions (40 mM glucose), treatment with all extract concentrations significantly decreased HbA1c formation after 7 days compared with the positive control ($P<0.05$), with the maximum inhibitory effect again observed at 0.1 g/dL. After 14 days of incubation at 40 mM glucose, significant reductions in HbA1c were maintained at 0.1 and 0.5 g/dL ($P<0.05$), whereas the highest extract concentration (1 g/dL) did not result in a significant decrease relative to the positive control. Across all experimental conditions, the lowest extract concentration consistently exhibited the most pronounced inhibitory effect on HbA1c formation, while prolonged incubation enhanced the overall efficacy of the extract. A summary of quantitative results, including mean±standard deviation, percentage changes relative to positive control, and P-values, is provided in Table 1.

Table 1. Summary of the effects of different concentrations of *Pistacia atlantica* hydroalcoholic extract on HbA1c levels under hyperglycemic conditions.

Glucose Concentration (mM)	Incubation Time (Days)	Extract Concentration (g/dL)	HbA1c (% Mean±SD)	Percentage Change vs. Positive Control	P-value
20	7	Positive Control	9.22±0.106	—	—
20	7	0.1	8.56±0.071	↓ 16.7%	P<0.05
20	7	0.5	9.32±0.070	↑ 1.08%	P<0.05
20	7	1	9.32±0.070	↑ 1.08%	P<0.05
20	14	Positive Control	9.15±0.089	—	—
20	14	0.1	7.62±0.070	↓ 16.72%	P<0.05
20	14	0.5	8.66±0.071	↓ 5.35%	P<0.05
20	14	1	8.91±0.134	↓ 2.62%	P<0.05
40	7	Positive Control	20.68±0.254	—	—
40	7	0.1	16.12±0.073	↓ 22.04%	P<0.05
40	7	0.5	16.57±0.098	↓ 19.87%	P<0.05
40	7	1	18.07±0.113	↓ 12.62%	P<0.05
40	14	Positive Control	16.86±0.141	—	—
40	14	0.1	15.11±0.149	↓ 10.38%	P<0.05
40	14	0.5	15.94±0.049	↓ 5.46%	P<0.05
40	14	1	17.37±0.042	↑ 3.03%	P<0.05

The ↓ symbol indicates a decrease, and the ↑ symbol indicates an increase in the percentage of HbA1c compared to the positive control.

CONCLUSION

Glucose concentration and duration of exposure to hemoglobin are two critical factors influencing the Maillard reaction and the formation of HbA1c (9). In the present study, the direct effect of the hydroalcoholic extract of *Pistacia atlantica* fruit on HbA1c formation was evaluated under controlled *in vitro* hyperglycemic conditions. The findings demonstrated that treatment with the extract resulted in a significant reduction in HbA1c levels compared with the positive control, although the magnitude of this effect varied depending on extract concentration and incubation time. At both 20 and 40 mM glucose concentrations, the inhibitory effect of the extract was more pronounced after 14 days of incubation than after 7 days, indicating a time-dependent enhancement of antiglycation activity. Among the tested doses, the lowest concentration of the extract (0.1 g/dL) consistently exhibited the greatest inhibitory effect on HbA1c formation. In contrast, higher extract concentrations indicated reduced efficacy, and in some conditions, were associated with a relative increase in HbA1c levels compared with the positive control. This biphasic response suggests that optimal antiglycation activity occurs within a limited concentration range. The observed antiglycation effects are consistent with previous *in vitro* studies reporting the inhibitory role of medicinal plant extracts on hemoglobin glycation (8). These effects are commonly attributed to bioactive phytochemicals, particularly polyphenolic and terpenoid compounds, which may inhibit non-enzymatic glycation through direct interaction with reactive carbonyl or amino groups, as well as through antioxidant mechanisms that limit oxidative reactions associated with glycation progression (16). The reduced efficacy at higher extract concentrations may result from non-specific interactions between extract constituents and hemoglobin or alterations in the redox environment; however, this hypothesis requires further experimental confirmation (20). In conclusion, the present study demonstrated that the hydroalcoholic extract of *Pistacia atlantica* fruit effectively inhibited HbA1c formation under *in vitro* hyperglycemic conditions in a dose- and time-dependent manner, with maximal efficacy observed at the lowest tested concentration. These findings suggest that *Pistacia atlantica* may represent a promising plant-derived candidate for modulating early glycation processes related to chronic hyperglycemia. Nevertheless, further phytochemical characterization, mechanistic studies, and *in vivo* investigations are necessary to clarify its clinical relevance and therapeutic potential.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Research Ethics Committee of Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Iran (Ethical No. IR.IAU.SHK.REC.1403.096).

Funding

There is no funding support.

Authors' Contribution

All authors contributed equally to the conceptualization and writing of the manuscript and approved the final version.

Conflicts of Interest

The authors declared that there is no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors would like to extend their sincere gratitude to the staff of the Laboratory Complex at Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Iran, for their assistance with this study.

مجله طب مکمل

دوره ۱۵، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۴

https://cmja.arakmu.ac.ir/

مقاله پژوهشی

تأثیر عصارهٔ هیدروالکلی میوهٔ بنهٔ کوهی (*Pistacia atlantica*) بر تشکیل هموگلوبین گلیکوزیله‌شده (*HbA1c*) در نمونهٔ خون انسانی در شرایط آزمایشگاهی

سیده مریم زمانیان دهکردی[۱]، محمد زوارشانی[۲]، محسن جعفریان دهکردی[۳*]، محسن عسگری[۴]، مریم زوارشانی[۵]

۱. دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲. دکتری تخصصی باکتری‌شناسی، گروه میکروب‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۳. دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۴. کارشناس ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۵. دانشجو دکتری میکروب‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

* **نویسنده مسئول:** محسن جعفریان دهکردی، گروه علوم درمانگاهی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

ایمیل: mjafariand@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۱۵

واژگان کلیدی:

بنهٔ کوهی

برون‌تنی

گلیکاسیون

عصارهٔ گیاهی

هموگلوبین گلیکوزیله

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی اراک محفوظ است.

چکیده

مقدمه: تشکیل هموگلوبین گلیکوزیله‌شده (HbA1c) یکی از شاخص‌های مهم کنترل طولانی‌مدت قند خون و پیشرفت عوارض دیابت محسوب می‌شود. مطالعهٔ حاضر با هدف بررسی اثر عصارهٔ هیدروالکلی میوهٔ بنهٔ کوهی (*Pistacia atlantica*) بر میزان تشکیل HbA1c در نمونهٔ خون انسانی در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعهٔ برون‌تنی، نمونه‌های خون انسانی در معرض گلوکز با غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌مولار قرار گرفته و با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ گرم بر دسی‌لیتر عصارهٔ هیدروالکلی میوهٔ بنهٔ کوهی تیمار شدند. میزان HbA1c گروه‌ها پس از ۷ و ۱۴ روز انکوباسیون با استفاده از روش کلرمتریک اندازه‌گیری و نتایج با گروه کنترل مثبت مقایسه شد. تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی انجام شد و سطح معناداری $P<0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تیمار نمونه‌های خون انسانی با عصارهٔ هیدروالکلی بنهٔ کوهی در شرایط هایپرگلیسمیک با غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌مولار گلوکز موجب کاهش آماری معنادار میزان HbA1c نسبت به گروه کنترل مثبت شد ($P<0/05$). این کاهش در هر دو زمان انکوباسیون مشاهده شد، به‌گونه‌ای که شدت اثر مهاری عصاره در روز چهاردهم نسبت به روز هفتم افزایش یافت. بیشترین کاهش HbA1c در تمامی شرایط مطالعه مربوط به غلظت ۰/۱ گرم بر دسی‌لیتر عصاره بود، درحالی‌که در غلظت‌های بالاتر، میزان کاهش HbA1c کمتر شده و در برخی شرایط افزایش نسبی HbA1c نسبت به کنترل مثبت مشاهده شد. نتایج به‌طور کلی نشان داد که اثر عصارهٔ هیدروالکلی بنهٔ کوهی بر مهار تشکیل هموگلوبین گلیکوزیله وابسته به دوز و زمان است.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد که عصارهٔ هیدروالکلی میوهٔ بنهٔ کوهی دارای پتانسیل مهار تشکیل HbA1c در شرایط آزمایشگاهی است و می‌تواند از طریق کاهش فرایند گلیکاسیون غیرآنزیمی، نقش بالقوه‌ای در پیشگیری یا تعدیل عوارض مرتبط با دیابت ایفا کند. بااین‌حال، انجام مطالعات بیشتر برای بررسی اثرات بالینی این عصاره ضروری به نظر می‌رسد.

Copyright © 2025 The Author(s); Published by Complementary Medicine Journal. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

مقدمه

دیابت شیرین یا دیابت ملیتوس یکی از شایع‌ترین بیماری‌های متابولیک مزمن در جهان محسوب می‌شود که با اختلال در ترشح یا عملکرد انسولین و افزایش پایدار غلظت گلوکز خون (هایپرگلیسمی) مشخص می‌شود (۱). کنترل‌نشدنِ مناسب این بیماری می‌تواند منجر به بروز طیف گسترده‌ای از عوارض حاد و مزمن شود که عملکرد بسیاری از سیستم‌های بدن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از جمله عوارض حاد دیابت می‌توان به هایپرگلیسمی شدید و کتواسیدوز دیابتی اشاره کرد که تهدیدکنندهٔ حیات بیمار هستند. عوارض مزمن دیابت عمدتاً ناشی از آسیب‌های پیش‌روندهٔ عروقی بوده و به دو دستهٔ میکرووواسکولار شامل رتینوپاتی، نفروپاتی و نوروپاتی، و ماکرووواسکولار شامل بیماری‌های قلبی–عروقی، سکتهٔ مغزی و بیماری عروق محیطی تقسیم می‌شوند (۲).

شواهد نشان می‌دهد که هایپرگلیسمی مزمن از طریق القای فرایندهای بیوشیمیایی خاص، به‌ویژه گلیکاسیون غیرآنزیمی پروتئین‌ها، نقش اساسی در ایجاد و پیشرفت عوارض دیابت ایفا می‌کند. واکنش گلیکاسیون غیرآنزیمی که به‌عنوان واکنش میلارد شناخته می‌شود، در اثر اتصال گروه کربونیل قندهای احیاکننده به گروه‌های آمینی پروتئین‌ها آغاز شده و در نهایت منجر به تشکیل محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته (Advanced Glycation End Products; AGEs) می‌شود (۳). این ترکیبات با تغییر خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها موجب اختلال در عملکرد طبیعی آن‌ها شده و در آسیب‌های بافتی مرتبط با دیابت نقش دارند. بنابراین، مهار یا کاهش تشکیل AGEs به‌عنوان یکی از اهداف مهم در کنترل عوارض دیابت مطرح است.

در شرایط هایپرگلیسمی، گلوکز از طریق انتشار تسهیل‌شده وارد گلبول‌های قرمز می‌شود و با هموگلوبین واکنش می‌دهد که نتیجهٔ آن تشکیل هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c) است. از آنجا که این فرایند به‌صورت تدریجی و غیرقابل برگشت در طول عمر حدود ۱۲۰روزهٔ گلبول قرمز رخ می‌دهد، HbA1c به‌عنوان شاخصی معتبر برای ارزیابی کنترل طولانی‌مدت قند خون شناخته می‌شود (۴). افزایش سطح HbA1c نه‌تنها بازتابی از وضعیت هایپرگلیسمی مزمن است، بلکه می‌تواند در تسریع تشکیل AGEs وابسته به هموگلوبین (Hb-AGEs) نیز نقش داشته باشد (۵).

در سال‌های اخیر، استفاده از گیاهان دارویی به‌عنوان رویکردی مکمل برای مهار فرایند گلیکاسیون و کاهش تشکیل پروتئین‌های گلیکوزیله مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات نشان داده‌اند که ترکیبات زیست‌فعال گیاهی نظیر پلی‌فنول‌ها، فلاونوئیدها و ترپنوئیدها می‌توانند از طریق مهار واکنش‌های گلیکاسیون و کاهش استرس اکسیداتیو، در جلوگیری از تشکیل AGEs مؤثر باشند (۶). باوجود گزارش اثرات ضددیابتی بسیاری از گیاهان دارویی در شرایط درون‌تنی، مطالعات برون‌تنی مستقیم بر روی هموگلوبین انسانی به‌منظور ارزیابی اثر عصاره‌ها بر تشکیل HbA1c همچنان محدود است. در این زمینه، اثرات کاهندهٔ عصاره‌هایی مانند هندوانهٔ ابوجهل، گل سرخ، شوید و سیر بر میزان HbA1c در شرایط برون‌تنی گزارش شده است (۷-۹).

بنهٔ کوهی یا پستهٔ کوهی (*Pistacia atlantica*) یکی از گونه‌های بومی ایران از جنس *Pistacia* است که به‌طور گسترده در مناطق کوهستانی و نیمه‌خشک خاورمیانه پراکنش دارد. مطالعات فیتوشیمیایی مبتنی‌بر آنالیزهای کروماتوگرافی نشان داده‌اند که بنهٔ کوهی حاوی طیف متنوعی از ترکیبات زیست‌فعال است. مهم‌ترین ترکیبات گزارش‌شده شامل مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترپن‌هایی مانند α-pinene، β-pinene، limonene و β-caryophyllene و همچنین ترکیبات فنولی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجه است (۱۰). این ترکیبات به‌عنوان عوامل مؤثر در مهار استرس اکسیداتیو، تعدیل مسیرهای التهابی و کاهش واکنش‌های شیمیایی مضر در سیستم‌های زیستی شناخته می‌شوند. ازاین‌رو، استفادهٔ سنتی از بنهٔ کوهی در طب گیاهی برای درمان بیماری‌های التهابی و اختلالات متابولیک، با شواهد فیتوشیمیایی و زیست‌فعال گزارش‌شده هم‌خوانی دارد. افزون بر این، برخی مطالعات تجربی پیشنهاد کرده‌اند که عصاره‌های بنهٔ کوهی می‌توانند از طریق اثرات آنتی‌اکسیدانی و تعدیل متابولیسم گلوکز در کنترل فرایندهای مرتبط با دیابت نقش داشته باشند (۱۱).

بر این اساس، مطالعهٔ حاضر با هدف بررسی اثر عصارهٔ هیدروالکلی میوهٔ بنهٔ کوهی بر میزان تشکیل هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c)، به‌عنوان یکی از شاخص‌های اولیه و پیش‌سازهای شیمیایی تشکیل AGEs، در نمونه‌های خون انسانی تحت شرایط برون‌تنی طراحی شد.

روش کار

نمونه‌برداری و آماده‌سازی گیاه:

میوه‌های درخت بنهٔ کوهی از مناطق کوهستانی استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری شد. پس از تأیید هویت گیاهی نمونه‌ها توسط مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان (کد هرباریوم: D-7400)، انتقال آن‌ها به مجتمع آزمایشگاه‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام پذیرفت.

تهیه عصارهٔ هیدروالکلی بنهٔ کوهی

برای استخراج عصاره، ۲۰۰ گرم از میوهٔ تازه بنهٔ کوهی پس از شست‌وشو با آب مقطر و خشک‌شدن در دمای محیط (۲۵±۲ °C) به کمک آسیاب مکانیکی به پودر تبدیل شد. سپس ۱۰۰ گرم از پودر حاصل با ۴۰۰ میلی‌لیتر حلال هیدروالکلی (معادل ۳۰۰ میلی‌لیتر اتانول و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) مخلوط و به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه) انکوبه شد. پس از گذشت زمان انکوباسیون، سوسپانسیون حاصل با استفاده از کاغذ صافی واتمن شمارهٔ ۱ و قیف شیشه‌ای فیلتر شد. فیلترات به‌دست‌آمده در پتری‌دیش‌های استریل ریخته شده و در دستگاه فریزدرایر (دمای ۵۰- °C، فشار ۰/۰۱ mbar) لیوفیلیزه شد. پودر خشک‌شدهٔ عصاره با کاردک استریل جمع‌آوری و برای تهیهٔ محلول‌های کاری با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ گرم بر دسی‌لیتر در آب مقطر استریل حل شد (۱۲).

جداسازی هموگلوبین از خون انسان

به منظور جداسازی هموگلوبین، مقدار ۲۰ میلی‌لیتر خون وریدی از یک اهداکنندهٔ سالم واحد تهیه شد. اهداکننده یک فرد بالغ سالم، فاقد سابقهٔ بیماری دیابت و سایر اختلالات متابولیک بود که پس از اندازه‌گیری قند خون ناشتا با استفاده از دستگاه گلوکومتر (GlucoSure STAR, Taiwan) و اطمینان از طبیعی بودن آن، در مطالعه شرکت داده شد. انتخاب یک اهداکنندهٔ واحد با هدف کاهش تغییرپذیری بین‌فردی و حذف اثر عوامل ژنتیکی و فیزیولوژیک بالقوهٔ مؤثر بر فرایند گلیکاسیون هموگلوبین انجام گرفت. از لوله‌های خون‌گیری مخصوص تست CBC و حاوی مادهٔ ضدانعقاد EDTA جهت اخذ نمونهٔ خون استفاده شد. سپس نمونهٔ خون به لوله‌های

فالکون منتقل شد و یک نوبت به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. در مرحلهٔ بعد بخش رویی محصول که شامل پلاسما بود با استفاده از سمپلر خارج و هم حجم نمونهٔ خون درون لوله‌ها سرم فیزیولوژی اضافه شد. سپس نمونه‌ها با ورتکس دستی به‌مدت ۳۰ ثانیه همگن شده و تحت همان شرایط (دور و زمان مشخص‌شده) مجدداً سانتریفیوژ شدند. این مرحله ۵ نوبت تا زمان شست‌وشوی کامل گلبول‌های قرمز تکرار شد. در مرحلهٔ بعدی حجم گلبول‌های قرمز شسته‌شدهٔ داخل لوله‌ها تعیین شد و ۲ برابر حجم آن بافر فسفات ۰/۰۱ مولار (Sigma-Aldrich, USA) و نیم برابر حجم آن تترا کلراید کربن (CCL4) (Merck, Germany) به لوله‌ها اضافه شد. سپس لوله‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه و در نهایت به‌مدت ۱۵ دقیقه با ۲۵۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. پس از این مرحله، محلول شفاف رویی از اجزای لیزشدهٔ گلبول‌های قرمز جداسازی شد (۷). بخش اخیر شامل هموگلوبین جداشده از همولیزات بود که به اختصار هموگلوبین نامیده شد و برای انجام مراحل بعدی آزمایش استفاده شد. نمونه‌ها بلافاصله پس از جداسازی مورد استفاده قرار گرفتند و از انجماد آن‌ها در طول فرایند آزمایش اجتناب شد.

ایجاد شرایط هایپرگلیسمیک (ازدیاد قند خون)

با استفاده از پودر D-گلوکز (Sigma-Aldrich, USA) غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌مولار گلوکز به‌منظور شبیه‌سازی شرایط هایپرگلیسمیک تهیه شد.

بررسی تأثیرگذاری عصاره

مطابق جدول شمارهٔ ۱ گروه‌های مختلف مطالعه با استفاده از غلظت‌های مشخص عصاره، گلوکز و هموگلوبین، آماده‌سازی شدند. به‌منظور افزایش صحت و دقت سنجش تأثیرگذاری، تمامی گروه‌ها با دو تکرار تهیه شدند. همچنین به‌منظور پیشگیری از آلودگی نمونه‌ها، ۵۰ میکرولیتر جنتامایسین با غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (Exir, Iran) اضافه شد. پس از آماده‌سازی گروه‌های مطالعه، نمونه‌ها در میکروتیوب‌های پلی‌پروپیلنی دربستهٔ ۲ میلی‌لیتری قرار داده شده و به مدت ۷ و ۱۴ روز در شرایط تاریکی و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. به‌منظور جلوگیری از تأثیر تغییرات pH بر فرایند گلیکاسیون، تمامی مراحل انکوباسیون در محیط بافر فسفات با pH کنترل‌شده (۰/۱ ± ۷/۴) انجام شد (۱۳).

جدول ۱. روش آماده‌سازی گروه‌های درمانی و کنترل

گروه	گلوکز	عصارهٔ هیدروالکلی	هموگلوبین
گروه درمانی	۵۰۰ میکرولیتر، ۴۰ میلی‌مولار	۵۰۰ میکرولیتر، ۰/۱ گرم بر دسی‌لیتر	۵۰۰ میکرولیتر
گروه درمانی	۵۰۰ میکرولیتر، ۴۰ میلی‌مولار	۵۰۰ میکرولیتر، ۰/۵ گرم بر دسی‌لیتر	۵۰۰ میکرولیتر
گروه درمانی	۵۰۰ میکرولیتر، ۴۰ میلی‌مولار	۵۰۰ میکرولیتر، ۱ گرم بر دسی‌لیتر	۵۰۰ میکرولیتر
گروه کنترل مثبت	۵۰۰ میکرولیتر، ۴۰ میلی‌مولار	-	۵۰۰ میکرولیتر
گروه کنترل منفی	-	-	۵۰۰ میکرولیتر
گروه درمانی	۵۰۰ میکرولیتر، ۲۰ میلی‌مولار	۵۰۰ میکرولیتر، ۰/۱ گرم بر دسی‌لیتر	۵۰۰ میکرولیتر
گروه درمانی	۵۰۰ میکرولیتر، ۲۰ میلی‌مولار	۵۰۰ میکرولیتر، ۰/۵ گرم بر دسی‌لیتر	۵۰۰ میکرولیتر
گروه درمانی	۵۰۰ میکرولیتر، ۲۰ میلی‌مولار	۵۰۰ میکرولیتر، ۱ گرم بر دسی‌لیتر	۵۰۰ میکرولیتر
گروه کنترل مثبت	۵۰۰ میکرولیتر، ۲۰ میلی‌مولار	-	۵۰۰ میکرولیتر
گروه کنترل منفی	-	-	۵۰۰ میکرولیتر

اندازه‌گیری هموگلوبین گلایکه‌شده (HbA1c)

به‌منظور اندازه‌گیری هموگلوبین گلایکه‌شده از کیت کالریمتریک شرکت مهسایاران (ایران) استفاده شد. این روش براساس واکنش اختصاصی گروه‌های گلیکوزیلهٔ هموگلوبین و تبدیل آن‌ها به مشتقات رنگ‌زا عمل می‌کند. به‌طور خلاصه، HbA1c در مجاورت اسید استیک هیدرولیز شده و به ۵-هیدروکسی‌متیل‌فورفورال تبدیل می‌شود. در ادامه، پروتئین‌های غیرواکنش‌یافته با استفاده از کلرواستیک اسید رسوب داده و مایع رویی با معرف تیوباربیتوریک اسید واکنش می‌دهد و کمپلکس رنگی زرد ایجاد می‌کند. شدت رنگ حاصل با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (BioTek, USA) در طول موج ۴۳۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای کمّی‌سازی HbA1c، منحنی استاندارد براساس استانداردهای ارائه‌شده در داخل کیت رسم شد و مقادیر نمونه‌ها براساس این منحنی محاسبه شدند (۱۴). با توجه به ماهیت برون‌تنی مطالعهٔ حاضر و تمرکز بر مقایسهٔ نسبی تغییرات HbA1c بین گروه‌های تیمار و کنترل تحت شرایط کاملاً یکسان آزمایشگاهی، از این روش به‌عنوان روشی تکرارپذیر و مناسب در این چهارچوب استفاده شد. تمامی اندازه‌گیری‌ها به‌صورت مستقل و تحت شرایط کاملاً یکسان انجام گرفت و نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار و بر حسب درصد گزارش شد.

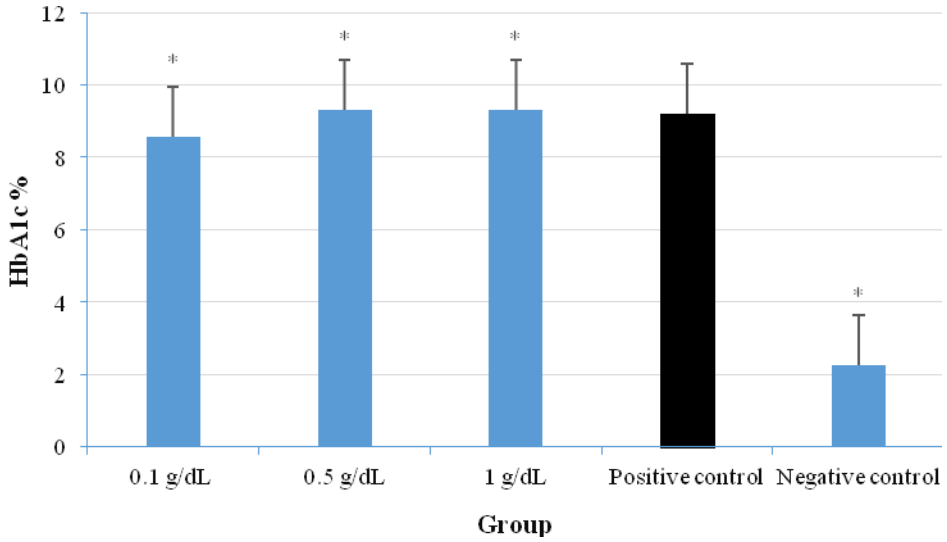
تجزیه و تحلیل داده‌ها

با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخهٔ ۲۶ تجزیه و تحلیل داده‌ها انجام شد. بدین منظور از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و تست تعقیبی توکی (Tukey) جهت شناسایی اختلاف معنادار آماری در میزان تشکیل هموگلوبین گلیکوزیله‌شده بین گروه‌های درمانی و گروه کنترل مثبت استفاده شد. سطح معناداری در مطالعهٔ حاضر برابر با $P<0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تأثیر دوزهای مختلف عصارهٔ هیدروالکلی بنهٔ کوهی بر میزان HbA1c در شرایط هایپرگلیسمیک ۲۰ میلی‌مولار گلوکز در روز ۷

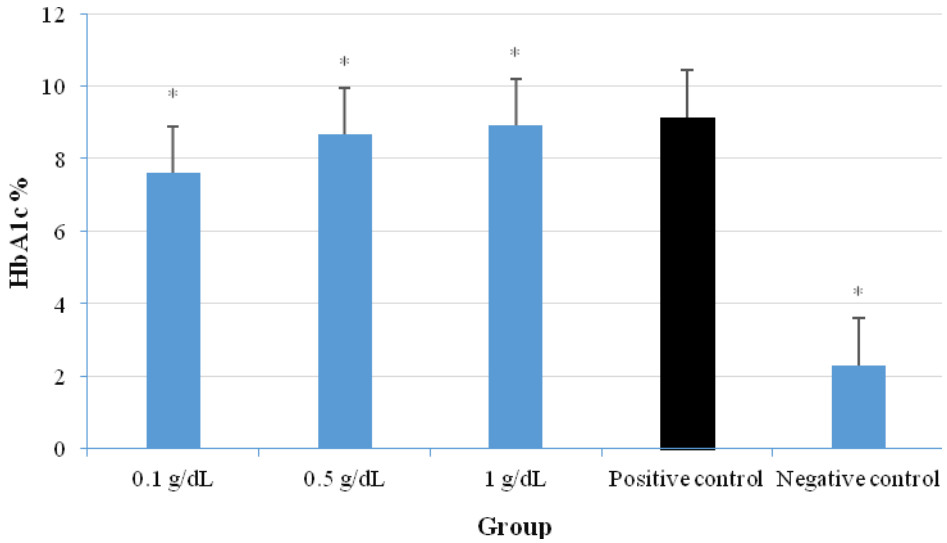
نتایج نشان داد که تیمار نمونه‌ها با عصارهٔ هیدروالکلی بنهٔ کوهی در غلظت ۰/۱ گرم بر دسی‌لیتر موجب کاهش معنادار میزان HbA1c شد (آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی، $P<0/05$). به‌طوری‌که مقدار HbA1c در این گروه ۰/۰۷۱ ± ۸/۵۶ اندازه‌گیری شد. این مقدار در مقایسه با گروه کنترل مثبت (حاوی هموگلوبین و گلوکز ۲۰ میلی‌مولار) معادل ۷/۱۶ درصد کاهش را نشان داد. در غلظت‌های بالاتر عصاره، کاهش HbA1c در مقایسه با گروه کنترل مثبت مشاهده نشد (نمودار ۱).



نمودار ۱. مقایسهٔ آماری میانگین ± انحراف معیار میزان تشکیل هموگلوبین A1c (پس از هفت روز) در غلظت ۲۰ میلی‌مولار گلوکز و تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عصارهٔ هیدروالکلی گیاه بنهٔ کوهی (وجود علامت * نشان‌دهندهٔ اختلاف آماری معنادار با گروه کنترل مثبت است).

تأثیر دوزهای مختلف عصارهٔ هیدروالکلی بنهٔ کوهی بر میزان HbA1c در شرایط هایپرگلیسمیک ۲۰ میلی‌مولار گلوکز در روز ۱۴

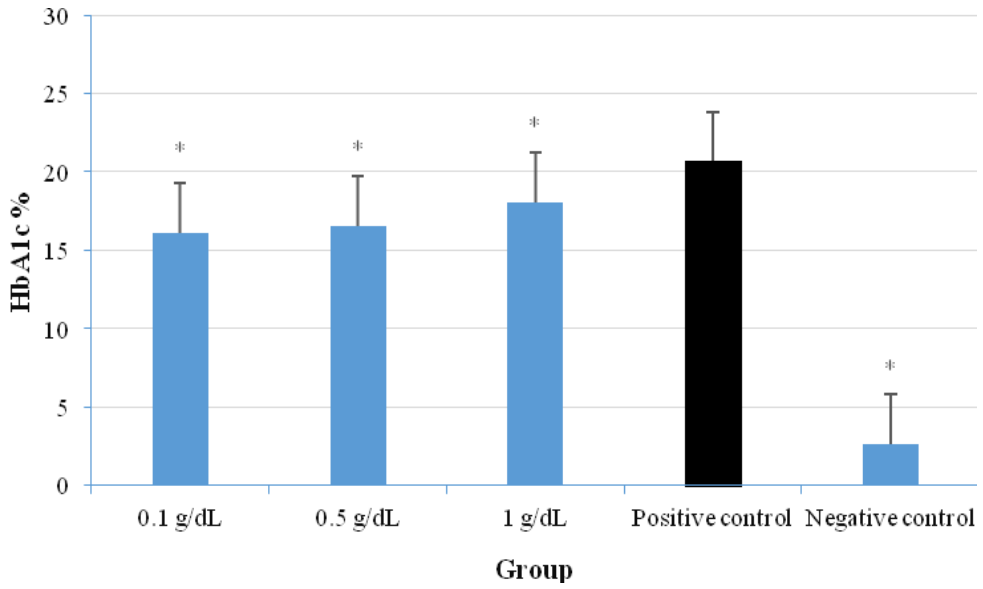
نتایج نشان داد که تیمار نمونه‌ها با دوزهای مختلف عصارهٔ هیدروالکلی بنهٔ کوهی موجب کاهش آماری معنادار میزان هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c) نسبت به گروه کنترل مثبت (حاوی هموگلوبین و گلوکز ۲۰ میلی‌مولار) شد (آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی، P<۰/۰۵). به‌طوری‌که مقدار HbA1c در گروه‌های تیمارشده با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ گرم بر دسی‌لیتر برابر با ۰/۰۷۰ ± ۷/۶۲، ۰/۰۷۱ ± ۸/۶۶ و ۰/۱۳۴ ± ۸/۹۱ اندازه‌گیری شد (نمودار ۲). در این شرایط نیز بیشترین درصد کاهش HbA1c نسبت به گروه کنترل مثبت در غلظت ۰/۱ گرم بر دسی‌لیتر (معادل ۱۶/۷۲ درصد) مشاهده شد. همچنین میزان کاهش HbA1c در روز چهاردهم نسبت به روز هفتم بیشتر بوده که بیانگر تقویت اثر مهاری عصاره به‌صورت وابسته به زمان است.



نمودار ۲. مقایسهٔ آماری میانگین ± انحراف معیار میزان تشکیل هموگلوبین A1c (پس از چهارده روز) در غلظت ۲۰ میلی‌مولار گلوکز و تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عصارهٔ هیدروالکلی گیاه بنهٔ کوهی (وجود علامت * نشان‌دهندهٔ اختلاف آماری معنادار با گروه کنترل مثبت است).

تأثیر دوزهای مختلف عصارهٔ هیدروالکلی بنهٔ کوهی بر میزان HbA1c در شرایط هایپرگلیسمیک ۴۰ میلی‌مولار گلوکز در روز ۷

نتایج نشان داد که تیمار نمونه‌ها با دوزهای مختلف عصارهٔ هیدروالکلی بنهٔ کوهی موجب کاهش آماری معنادار میزان هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c) نسبت به گروه کنترل مثبت (حاوی هموگلوبین و گلوکز ۴۰ میلی‌مولار) شد (آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی، P<۰/۰۵). به‌طوری‌که مقدار HbA1c در گروه‌های تیمارشده با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ گرم بر دسی‌لیتر برابر با ۰/۰۷۳ ± ۱۶/۱۲، ۰/۰۹۸ ± ۱۶/۵۷ و ۰/۱۱۳ ± ۱۸/۰۷ اندازه‌گیری شد (نمودار ۳). در این شرایط نیز بیشترین درصد کاهش HbA1c نسبت به گروه کنترل مثبت در غلظت ۰/۱ گرم بر دسی‌لیتر (معادل ۲۲/۰۴ درصد) مشاهده شد.

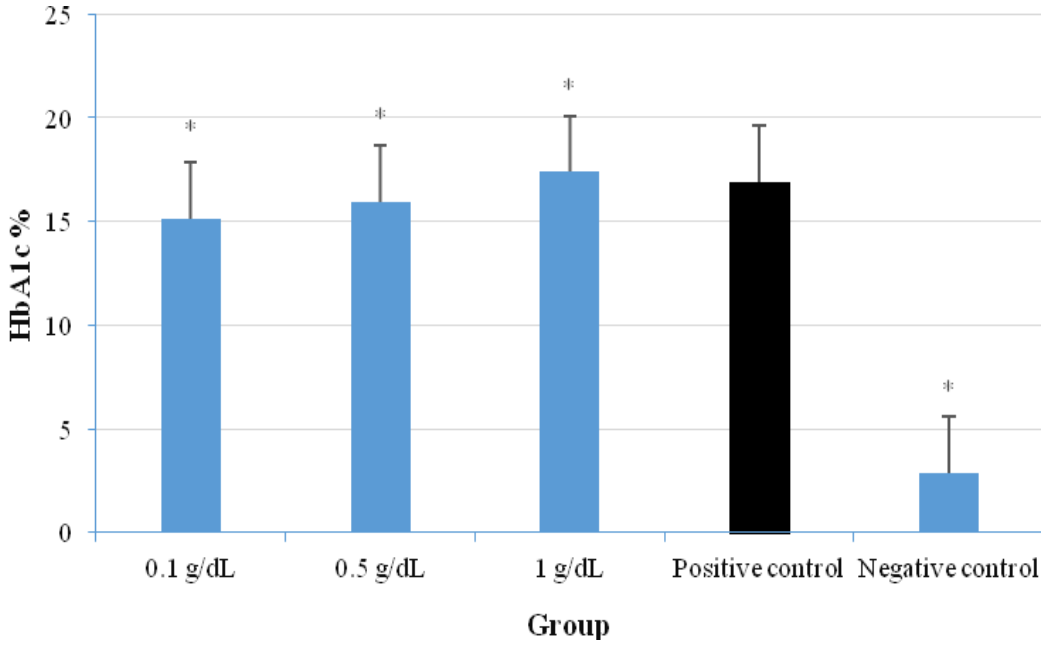


نمودار ۳. مقایسهٔ آماری میانگین ± انحراف معیار میزان تشکیل هموگلوبین A1c (پس از هفت روز) در غلظت ۴۰ میلی‌مولار گلوکز و تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عصارهٔ هیدروالکلی گیاه بنهٔ کوهی (وجود علامت * نشان‌دهندهٔ اختلاف آماری معنادار با گروه کنترل مثبت است).

تأثیر دوزهای مختلف عصارهٔ هیدروالکلی بنهٔ کوهی بر میزان HbA1c در شرایط هایپرگلیسمیک ۴۰ میلی‌مولار گلوکز در روز ۱۴

نتایج نشان داد که تیمار نمونه‌ها با عصارهٔ هیدروالکلی بنهٔ کوهی در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ گرم بر دسی‌لیتر موجب کاهش معنادار میزان HbA1c شد (آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی، P<۰/۰۵). به‌طوری‌که مقدار HbA1c در این گروه‌ها به‌ترتیب ۰/۱۴۹ ± ۱۵/۱۱ و ۰/۴۹ ± ۱۵/۹۴ اندازه‌گیری شد. این مقدار در مقایسه با گروه کنترل مثبت (حاوی هموگلوبین و گلوکز ۴۰ میلی‌مولار) به‌ترتیب معادل ۱۰/۳۸ و ۵/۴۶ درصد کاهش را نشان داد (نمودار ۴). در غلظت بالاتر عصاره، کاهش HbA1c در مقایسه با گروه کنترل مثبت مشاهده نشد. همچنین میزان کاهش HbA1c در روز چهاردهم نسبت به روز هفتم بیشتر بوده که بیانگر تقویت اثر مهاری عصاره به‌صورت وابسته به زمان است.

به‌منظور جمع‌بندی و تسهیل مقایسهٔ نتایج حاصل از تیمارهای مختلف، خلاصهٔ داده‌های عددی شامل میانگین ± انحراف معیار، درصد تغییر میزان HbA1c نسبت به گروه کنترل مثبت و مقادیر P-value برای تمامی شرایط آزمایش در جدول ۲ ارائه شده است.



نمودار ۴. مقایسهٔ آماری میانگین ± انحراف معیار میزان تشکیل هموگلوبین A1c (پس از چهارده روز) در غلظت ۴۰ میلی‌مولار گلوکز و تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عصارهٔ هیدروالکلی گیاه بنهٔ کوهی (وجود علامت * نشان‌دهندهٔ اختلاف آماری معنادار با گروه کنترل مثبت است).

جدول ۲. خلاصهٔ نتایج تأثیر غلظت‌های مختلف عصارهٔ هیدروالکلی بنهٔ کوهی بر میزان HbA1c در شرایط هایپرگلیسمیک

غلظت گلوکز (mM)	زمان انکوباسیون (روز)	غلظت عصاره (g/dL)	HbA1c (٪ میانگین ± انحراف معیار)	درصد تغییر نسبت به کنترل مثبت	P-value
۲۰	۷	کنترل مثبت	۹/۲۲ ± ۰/۱۰۶	—	—
۲۰	۷	۰/۱	۸/۵۶ ± ۰/۰۷۱	↓ ۷/۱۶	P<۰/۰۵
۲۰	۷	۰/۵	۹/۳۲ ± ۰/۰۷۰	↑ ۱/۰۸	P<۰/۰۵
۲۰	۷	۱	۹/۳۲ ± ۰/۰۷۰	↑ ۱/۰۸	P<۰/۰۵
۲۰	۱۴	کنترل مثبت	۹/۱۵ ± ۰/۰۸۹	—	—
۲۰	۱۴	۰/۱	۷/۶۲ ± ۰/۰۷۰	↓ ۱۶/۷۲	P<۰/۰۵
۲۰	۱۴	۰/۵	۸/۶۶ ± ۰/۰۷۱	↓ ۵/۳۵	P<۰/۰۵
۲۰	۱۴	۱	۸/۹۱ ± ۰/۱۳۴	↓ ۲/۶۲	P<۰/۰۵
۴۰	۷	کنترل مثبت	۲۰/۶۸ ± ۰/۲۵۴	—	—
۴۰	۷	۰/۱	۱۶/۱۲ ± ۰/۰۷۳	↓ ۲۲/۰۴	P<۰/۰۵
۴۰	۷	۰/۵	۱۶/۵۷ ± ۰/۰۹۸	↓ ۱۹/۸۷	P<۰/۰۵
۴۰	۷	۱	۱۸/۰۷ ± ۰/۱۱۳	↓ ۱۲/۶۲	P<۰/۰۵
۴۰	۱۴	کنترل مثبت	۱۶/۸۶ ± ۰/۱۴۱	—	—
۴۰	۱۴	۰/۱	۱۵/۱۱ ± ۰/۱۴۹	↓ ۱۰/۳۸	P<۰/۰۵
۴۰	۱۴	۰/۵	۱۵/۹۴ ± ۰/۰۴۹	↓ ۵/۴۶	P<۰/۰۵
۴۰	۱۴	۱	۱۷/۳۷ ± ۰/۰۴۲	↑ ۳/۰۳	P<۰/۰۵

علامت ↓ نشان‌دهندهٔ کاهش و ↑ نشان‌دهندهٔ افزایش درصد HbA1c نسبت به کنترل مثبت است.

بحث

غلظت گلوکز و مدت زمان مواجههٔ آن با هموگلوبین، دو عامل مهم تأثیرگذار بر بروز واکنش میلارد است. با افزایش غلظت گلوکز، اتصال گروه هم به گلوبین تضعیف شده و تغییرات ساختاری در مولکول هموگلوبین ایجاد می‌شود که این تغییرات منجر به کاهش شدت جذب نور می‌شود (۹). بر این اساس، میزان گلایکه‌شدن هموگلوبین در حضور و عدم حضور غلظت‌های مختلف عصارهٔ هیدروالکلی میوهٔ بنهٔ کوهی ارزیابی شد. اثرات ضددیابتی گیاه بنهٔ کوهی قبلاً در مطالعات مختلفی در انسان و رت گزارش شده است (۱۱،۱۵،۱۶). با توجه به اینکه متغیر اصلی مطالعهٔ حاضر بررسی میزان تشکیل هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c) در پی افزایش تجربی قند خون بود، این پژوهش با هدف ارزیابی اثر مستقیم عصارهٔ هیدروالکلی میوهٔ بنهٔ کوهی بر تشکیل HbA1c در شرایط برون‌تنی طراحی و اجرا شد. همان‌طور که در مطالعهٔ حاضر مشاهده شد در تمامی غلظت‌های عصارهٔ هیدروالکلی بنهٔ کوهی در روزهای مختلف مطالعه و در شرایط ۲۰ میلی‌مولار غلظت گلوکز، در مقایسه با گروه کنترل مثبت، میزان تشکیل هموگلوبین A1c به‌صورت معنادار متفاوت بود، به‌طوری که در روز هفت صرفاً در غلظت ۰/۱ گرم بر دسی‌لیتر عصاره شاهد کاهش معنادار هموگلوبین A1c در مقایسه با گروه کنترل مثبت بودیم. ولی به دنبال افزایش مدت زمان انکوباسیون از هفت به چهارده روز میزان تعدیل‌دهندگی افزایش یافت و در تمامی غلظت‌های عصارهٔ هیدروالکلی میزان تشکیل هموگلوبین A1c در مقایسه با گروه کنترل مثبت به‌صورت معنادار کمتر بود (جدول ۲). همچنین در روز هفت و غلظت ۴۰ میلی‌مولار گلوکز نیز به‌طور مشخص و معنادار نتایج حاکی از کاهش میزان تشکیل هموگلوبین A1c در مقایسه با گروه کنترل مثبت در تمامی غلظت‌های عصارهٔ گیاهی بود.

به‌دنبال افزایش مدت زمان انکوباسیون نیز کاهش میزان تشکیل هموگلوبین A1c تقویت یافت ولیکن این کاهش در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ گرم بر دسی‌لیتر عصاره معنادار بود (جدول ۲). نتایج اخیر می‌تواند تأییدکنندهٔ تأثیر عوامل محیطی نظیر مدت زمان مواجهه عصارهٔ هیدروالکلی و هموگلوبین بر میزان گلیکاسیون باشد. از طرف دیگر، ایجاد HbA1c در واکنش میلارد صرفاً واکنشی غیرآنزیمی بوده و غلظت مواد (شامل گلوکز، عصارهٔ هیدروالکلی بنهٔ کوهی و هموگلوبین)، تأثیر مستقیم بر ایجاد هموگلوبین A1c دارد (۷).

نتایج مطالعهٔ حاضر با یافته‌های گزارش‌شده در مطالعات پیشین در خصوص اثر عصاره‌های گیاهی بر مهار فرایند گلیکاسیون هموگلوبین هم‌سو است. به‌عنوان مثال، فتاح‌پور (Fattahpour) و همکاران نشان دادند که عصارهٔ هیدروالکلی سیر می‌تواند در شرایط برون‌تنی منجر به کاهش معنادار تشکیل هموگلوبین گلیکوزیله شود (۷). همچنین در مطالعهٔ کریم‌آباد (Karimabad) و همکاران، اثر مهاری عصارهٔ *Citrullus colocynthis* بر تشکیل HbA1c در شرایط آزمایشگاهی گزارش شده است (۸). شباهت نتایج این مطالعات با یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد که ترکیبات زیست‌فعال موجود در گیاهان دارویی می‌توانند نقش مهمی در تعدیل مراحل اولیهٔ گلیکاسیون هموگلوبین ایفا کنند.

از نظر مکانیسم اثر احتمال می‌رود عصارهٔ هیدروالکلی میوهٔ بنهٔ کوهی از طریق چند مسیر مکمل منجر به کاهش تشکیل HbA1c شود. یکی از این مسیرها، مهار مستقیم واکنش گلیکاسیون غیرآنزیمی از طریق برهم‌کنش ترکیبات پلی‌فنولی با گروه‌های کربونیل قندهای احیاکننده یا گروه‌های آمینی پروتئین‌ها است. علاوه‌بر این، فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات موجود در بنهٔ کوهی می‌تواند با کاهش گونه‌های فعال اکسیژن، از تسریع واکنش‌های اکسیداتیو مرتبط با پیشرفت گلیکاسیون جلوگیری کند. مطالعات پیشین وجود ترکیبات ترپنوئیدی و پلی‌فنولی با خواص آنتی‌اکسیدانی در گونهٔ *Pistacia atlantica* را گزارش کرده‌اند که می‌توانند در تبیین اثر مشاهده‌شده نقش داشته باشند (۱۶). در مجموع، هم‌خوانی نتایج مطالعهٔ حاضر با پژوهش‌های پیشین و مکانیسم‌های پیشنهادی، بیانگر پتانسیل عصارهٔ میوهٔ بنهٔ کوهی به‌عنوان یک عامل

گیاهی مؤثر در مهار مراحل اولیهٔ گلیکاسیون هموگلوبین است. بررسی اثرات ضددیابتی بنهٔ کوهی در شرایط درون‌تنی در بیماران دیابتی در تعدادی از مطالعات انجام پذیرفته است. نتایج این مطالعات نشان داد که بنهٔ کوهی منجر به کاهش معنادار میزان هموگلوبین A1c در شرایط درون‌تنی در بیماران می‌شود (۱۷،۱۸). از لحاظ اثربخشی، نتایج دو مطالعهٔ اخیر با نتایج مطالعه ما هم‌خوانی دارد. البته مطالعات دیگری نیز در خصوص کنترل افزایش قند خون در انسان با استفاده از بنهٔ کوهی، با اندازه‌گیری سایر پارامترهای خونی مرتبط انجام شده است.

در نمونه‌ای از این تحقیقات، اثرات ممانعت‌کنندگی بنهٔ کوهی بر آنزیم‌های مؤثر بر هضم و جذب کربوهیدرات‌ها در انسان گزارش شده است (۱۰). همچنین در مطالعه‌ای دیگر، اثرات مثبت بنهٔ کوهی بر کاهش میزان قند خون و شاخص‌های هیستوپاتولوژیک مرتبط در موش‌های دیابتی تأیید شده است (۱۹). نتایج این مطالعات نیز از لحاظ تأیید اثرات ضددیابتی بنهٔ کوهی با مطالعهٔ حاضر هم‌خوانی دارد. نتایج مطالعهٔ حاضر نشان داد که غلظت ۰/۱ گرم بر دسی‌لیتر عصارهٔ هیدروالکلی بنهٔ کوهی مؤثرترین دوز در کاهش میزان تشکیل هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c) بود. در مقابل، در غلظت‌های بالاتر عصاره، کاهش اثربخشی در مهار تشکیل HbA1c مشاهده شد و در برخی موارد، میزان HbA1c حتی نسبت به گروه کنترل مثبت افزایش یافت (جدول ۲). مشاهدهٔ کاهش اثربخشی عصارهٔ هیدروالکلی بنهٔ کوهی در غلظت بالاتر (۱ گرم بر دسی‌لیتر) می‌تواند ناشی از عوامل متعددی باشد. مطابق شواهد، برهم‌کنش غیراختصاصی ترکیبات زیست‌فعال عصاره، به‌ویژه پلی‌فنول‌ها، با هموگلوبین و تشکیل کمپلکس‌های پروتئین–پلی‌فنول ممکن است منجر به تغییرات ساختاری، کاهش دسترسی گروه‌های واکنش‌پذیر هموگلوبین یا ایجاد تجمعات نامحلول شود. بااین‌حال، از آنجا که در مطالعهٔ حاضر آزمایش مستقیمی برای بررسی این برهم‌کنش‌ها انجام نشده است، این توضیح صرفاً به‌عنوان یک فرضیه محتمل مطرح می‌شود. همچنین، تغییرات پتانسیل اکسیداسیون محیط واکنش در غلظت‌های بالا نیز ممکن است بر نتایج تأثیر گذاشته باشد (۲۰-۲۲). انجام مطالعات تکمیلی با استفاده از روش‌هایی نظیر طیف‌سنجی UV-Vis، فلورسانس یا سایر روش‌های بیوفیزیکی می‌تواند در آینده به تبیین دقیق‌تر مکانیسم اثر عصاره و برهم‌کنش آن با هموگلوبین کمک کند. کاهش مشاهده‌شدهٔ میزان HbA1c در گروه کنترل مثبت در روز چهاردهم نسبت به روز هفتم ممکن است ناشی از عواملی نظیر تخریب خودبه‌خودی پیوندهای گلیکوزیله، تغییرات ساختاری هموگلوبین در طی انکوباسیون طولانی‌مدت، یا کاهش غلظت مؤثر گلوکز در محیط واکنش باشد.

از آنجا که در این مطالعه پایش غلظت گلوکز در طول دورهٔ انکوباسیون و استفاده از مهارکننده‌های پروتئاز در نظر گرفته نشده بود، این مسئله به‌عنوان یکی از محدودیت‌های پژوهش تلقی می‌شود. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، با کنترل دقیق‌تر شرایط انکوباسیون از جمله اندازه‌گیری دوره‌ای غلظت گلوکز و استفاده از مهارکننده‌های پروتئاز، پایداری ساختاری هموگلوبین و صحت نتایج گلیکاسیون با دقت بیشتری ارزیابی شود. همچنین اگرچه در این مطالعه اندازه‌گیری مستقیم محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته (AGEs) انجام نشد، اما HbA1c به‌عنوان یکی از مراحل اولیه و پیش‌ساز تشکیل Hb-AGEs شناخته می‌شود. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که کاهش HbA1c می‌تواند منجر به کاهش تشکیل AGEs و پیامدهای پاتولوژیک مرتبط با آن شود. بااین‌حال، انجام سنجش‌های مستقیم AGEs با استفاده از روش‌های فلورسانس یا ELISA می‌تواند در مطالعات آینده به تبیین دقیق‌تر اثر عصارهٔ گیاهی بر مراحل پیشرفتهٔ گلیکاسیون کمک کند.

از محدودیت‌های مطالعهٔ حاضر، انجام‌نشدنِ تحلیل فیتوشیمیایی عصارهٔ هیدروالکلی میوهٔ بنهٔ کوهی به‌منظور شناسایی و تعیین کمّی ترکیبات زیست‌فعال مسئول اثر مشاهده شده است. بااین‌حال، مطالعات پیشین نشان داده‌اند که گونهٔ *Pistacia atlantica* حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات پلی‌فنولی، فلاونوئیدی و ترپنوئیدی نظیر آلفا-پینن و بتا-کاریوفیلن است که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و مهارکنندهٔ واکنش‌های گلیکاسیون هستند (۱۰). از این رو، احتمال می‌رود اثر کاهندهٔ تشکیل هموگلوبین A1c مشاهده‌شده در مطالعهٔ حاضر ناشی از فعالیت تجمعی این ترکیبات باشد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، با بهره‌گیری از روش‌هایی نظیر HPLC یا GC-MS، ترکیبات فعال عصارهٔ شناسایی‌شده و ارتباط مستقیم آن‌ها با مهار فرایند گلیکاسیون بررسی شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که عصارهٔ میوهٔ گیاه بنهٔ کوهی می‌تواند منجر به کاهش معنادار میزان تشکیل هموگلوبین A1c در شرایط برون‌تنی در انسان شود. یافته‌های اولیه این پژوهش حاکی از آن است که عصاره میوهٔ بنهٔ کوهی قادر به تعدیل تشکیل AGEs به عنوان یکی از دلایل عوارض ثانویهٔ هایپرگلیسمی مزمن است. تکمیل این نظریه و امکان استفاده از آن به عنوان بخشی از رژیم دارویی و یا غذایی، نیاز به مطالعات تکمیلی و همچنین انجام کارآزمایی بالینی به‌منظور شناسایی غلظت درمانی مؤثر در شرایط درون‌تنی، بررسی عوارض بالینی احتمالی عصارهٔ گیاهی و همچنین ارزیابی سایر پارامترهای مرتبط دارد.

ملاحظات اخلاقی

به‌منظور انجام مطالعهٔ حاضر مجوز لازم از کمیتهٔ تخصصی اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به شمارهٔ IR.IAU.SHK.REC.1403.096 اخذ شد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی مرتبط با این تحقیق وجود ندارد.

حامی مالی

این مقاله حامی مالی ندارد.

تشکر و قدردانی

مقالهٔ حاضر حاصل بخشی از نتایج مربوط به پایان‌نامهٔ مقطع دکتری حرفه‌ای نویسندهٔ اول است. بدین وسیله نویسندگان این مقاله از تمامی پرسنل محترم مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و سایر افرادی که در مراحل مختلف انجام مطالعهٔ حاضر یاری‌رسان بودند، کمال تشکر را دارند.

References

1. Rooney MR, Rawlings AM, Pankow JS, Tcheugui JBE, Coresh J, Sharrett AR, et al. Risk of progression to diabetes among older adults with prediabetes. JAMA Intern Med. 2021;181(4):511-9. doi: 10.1001/jamainternmed.2020.8774. pmid
2. Yu MG, Gordin D, Fu J, Park K, Li Q, King GL. Protective factors and the pathogenesis of complications in diabetes. Endocr Rev. 2024;45(2):227-52. doi: 10.1210/endrev/bnad030. pmid
3. Sourris KC, Watson A, Jandeleit-Dahm K. Inhibitors of advanced glycation end product (AGE) formation and accumulation. Handb Exp Pharmacol. 2021;264:395-423. doi: 10.1007/164_2020_391. pmid
4. Jia W, Guo A, Zhang R, Shi L. Mechanism of natural antioxidants regulating advanced glycosylation end products of Maillard reaction. Food Chem. 2023;404:134541. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.134541. pmid
5. Wolffenbuttel BH, Giordano D, Founds HW, Bucala R. Long-term assessment of glucose control by haemoglobin-AGE measurement. Lancet. 1996;347(9000):513-5. doi: 10.1016/s0140-6736(96)91141-1. pmid
6. Yousof Ali M, Jannat S, Mizanur Rahman M. Ginsenoside derivatives inhibit advanced glycation end-product formation and glucose–fructose mediated protein glycation in vitro via a specific structure–activity relationship. Bioorg Chem. 2021;111:104844. doi: 10.1016/j.bioorg.2021.104844. pmid
7. Fattahpour S, Hosseini F, Hajizadeh MR, Asadpour M, Hassanshahi Gh, Mirzaii Mr, et al. Surveying the effect of Hydroalcoholic extract of Allium hirtifolium on glycated hemoglobin formation in in-vitro condition. J Adv Biomed Sci. 2015;5(1):92-101. [Persian] Link
8. Karimabad MN, Niknia S, Golnabadi MB, Poor SF, Hajizadeh MR. Effect of Citrullus colocynthis extract on glycated hemoglobin formation (in vitro). Eurasian J Med. 2020;52(1):47-51. doi: 10.5152/eurasianjmed.2020.19223. pmid
9. Soleimani M, Shahanipour K. Hydroalcoholic extracts effect of Rosa damascena Mill And Anethum graveolens on the proteins glycosylation in vitro. J Med Plants. 2017;16(62):108-19. [Persian] Link
10. Pekacar S, Deliorman Orhan D. Investigation of antidiabetic effect of pistacia atlantica leaves by activity-guided fractionation and phytochemical content analysis by LC-QTOF-MS. Front Pharmacol. 2022;25(13):826261. doi: 10.3389/fphar.2022.826261. pmid
11. Memariani Z, Tatari M, Zahedi M, Hesari Z, Davarian A, Kolangi F. Evaluation of the effect of Pistacia atlantica oleoresin on blood sugar, pressure and lipids in patients with type 2 diabetes: a single-blind, Placebo-Controlled Trial. Endocrinol Diabetes Metab. 2024;7(4):e504. doi: 10.1002/edm2.504. pmid
12. Ghafouri-Khosrowshahi A, Farzami B, Mohammadi-Bardbori A. The inhibitory effect of garlic extract on formation of glycated hemoglobin and AGEPs. J Med Sci. 2007;7(6):1039-43. doi: 10.3923/jms.2007.1039.1043
13. Lipovac V, Gavella M, Sverko V. Effect of sialic acid on glycation-induced fluorescence of albumin. Acta Diabetol. 1994;31(3):156–9. doi: 10.1007/BF00570371. pmid
14. Shah SC, Malone JI, Harvey C. Glycosylated hemoglobin: colorimetric vs chromatographic measurement. Diabetes Res. 1986;3(7):381–6. pmid
15. Raziani Y, Qadir SH, Hermis AH, Nazari A, Othman BS, Raziani S. Pistacia atlantica as an effective remedy for diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Aust J Herbal Nat Med. 2022;34(3):118-24. doi: 10.33235/ajhnm.34.3.118-124
16. Yaseen Al-Edany ZT ,Alhelfi N, Pirnia M. The therapeutic effects of Pistacia Atlantica used in foods: a review. J Food Sci Technol (Iran). 2025;21(155):148-69. Link
17. Mahjoub F, Salari R, Yousefi M, Mohebbi M, Saki A, Rezayat KA. Effect of Pistacia atlantica kurdica gum on diabetic gastroparesis symptoms: a randomized, triple-blind placebo-controlled clinical trial. Electron Physician. 2018;10(7):6997-7007. doi: 10.19082/6997. pmid
18. Majd FS, Talebi SS, Ahmad Abadi AN, Poorolajal J, Dastan D. Efficacy of a standardized herbal product from Pistacia atlantica subsp. Kurdica in type 2 diabetic patients with hyperlipidemia: a triple-blind randomized clinical trial. Complement Ther Clin Pract. 2022;48:101613. doi: 10.1016/j.ctcp.2022.101613. pmid
19. Hashemnia M, Nikousefat Z, Yazdani-Rostam M. Antidiabetic effect of Pistacia atlantica and Amygdalus scoparia in streptozotocin-induced diabetic mice. Comp Clin Pathol. 2015;24(6):1301-6. Link
20. Cyboran S, Oszmiański J, Kleszczyńska H. Interaction between plant polyphenols and the erythrocyte membrane. Cell Mol Biol Lett. 2012;17(1):77-88. doi: 10.2478/s11658-011-0038-4. pmid
21. Xi J, Guo R. Interactions between flavonoids and hemoglobin in lecithin liposomes. Int J Biol Macromol. 2007;40(4):305-11. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2006.08.011. pmid
22. Yan X, Zhang G, Zhao J, Ma M, Bao X, Zeng Z, et al. Influence of phenolic compounds on the structural characteristics, functional properties and antioxidant activities of Alcalase-hydrolyzed protein isolate from Cinnamomum camphora seed kernel. LWT. 2021;148:111799. doi: 10.1016/j.lwt.2021.111799